

**ORBÁN ERIKA**

**Hatóanyag-tartalmú peptid-konjugátumok előállítás és *in vitro*  
tumorelles hatása**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

Témavezető:

Dr. Hudecz Ferenc

tanszékvezető egyetemi tanár, kutatócsoport vezető, az MTA levelező tagja

ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport



ELTE TTK Biológia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Erdei Anna egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Immunológia program

Programvezető: Dr. Erdei Anna egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Budapest, 2011.

## BEVEZETÉS

A tumoros megbetegedések a WHO (2008) statisztikája szerint világszerte a vezető halálokok között szerepelnek. A daganatos megbetegedések kezelésére többféle stratégia létezik: radioterápia, immunterápia, kemoterápia, sebészeti beavatkozás, illetve ezek kombinációja. A tumorelles hatású vegyületek közül doktori munkám során két klinikai használatban lévő kemoterápiás hatóanyaggal foglalkoztam: a daunomicinnel és a pemetrexeddel.

A daunomicin (Dau) az antraciklin típusú antibiotikumok közé tartozik. E vegyület egyike a leghatékonyabb kemoterápiás szereknek; elsősorban leukémiák gyógyítására használják. A pemetrexed az antimetabolitok családjába tartozó vegyület, amelyet főleg a nem-kissejtes tüdőrák és mezotelióma esetén használnak a klinikumban. E két vegyület közül egyik sem szelektív; hatásukat nem csupán tumorsejteken, hanem egészséges sejteken is kifejtik. Ennek következtében mindkét vegyületnek számos mellékhatása van.

A korábbi tapasztalatok azt mutatják, hogy a tumorelles szerek szelektivitása növelhető és így a mellékhatások súlyossága csökkenthető, ha a hatóanyagot valamilyen peptid hordozóhoz kapcsoljuk. Munkám során célbajuttató egységként egyrészt olyan oligopeptideket alkalmaztam, amelyek tumorsejtek felszínén fokozottan expresszáldó receptorhoz kötődnek, és így a hatóanyag-tartalmú konjugátum nagyobb mértékben juthat be a daganatos sejtekbe, mint az egészségesekbe. Ebbe az oligopeptid csoportba tartozik a gonadotropin-releasing hormon-III (GnRH-III), valamint az IELLQAR és az LTVSPWY szekvenciájú peptidek. A sejtpenetráló peptidek azáltal módosíthatják a kemoterápiás szer szelektivitását, hogy konjugátumaik más mechanizmussal juthatnak be a sejtbe, mint a peptidet nem tartalmazó hatóanyag. Ilyen módon módosíthatja az általunk is használt oligoarginin a kemoterápiás szerek hatását. A daunomicin diffúzióval jut át a sejtmembránon, míg az oligoargininnel konjugált hatóanyag más úton (makropinocitózis) kerül be a sejtbe.

## CÉLKITÚZÉSEK

Doktori munkám során tumorelles szerek peptid konjugátumainak előállítását és *in vitro* funkcionális jellemzését terveztem.

A konjugátumokban a hatóanyag (daunomicin vagy pemetrexed) oligopeptidhez kapcsolódik kovalens kötéssel. Daunomicin-konjugátumok esetén hordozó molekulaként a sejtpenetráló peptidek közé tartozó oligoarginin peptideket, vagy gonadotropin-releasing hormont (GnRH-

III), illetve a bizonyos tumorsejtekhez specifikusan kötődő LTVSPWY szekvenciájú peptidet kívántunk használni. A pemetrexedet szintén oligoargininhez és/vagy a szelektinekhez kötődő IELLQAR szekvenciájú peptidhez terveztük kapcsolni. Az alábbi konjugátum típusok előállítását terveztük:

- a) daunomicin-oligoarginin konjugátumok; többféle kötéstípus és különböző aminosav tagszámú oligoarginin alkalmazásával
- b) daunomicin-LTVSPWY konjugátum
- c) daunomicin-GnRH-III konjugátumok különböző távtartó egységek beépítésével (YRRL vagy GFLG), illetve azok használata nélkül
- d) oligoarginin és/vagy IELLQAR peptidet tartalmazó pemetrexed-konjugátumok

Céлом volt továbbá a szintetizált konjugátumok kémiai jellemzése és a konjugátumok biológiai hatásának *in vitro* körülmények közti tanulmányozása.

a) Vizsgálni kívántam, hogy a daunomicin-oligoarginin konjugátumokban lévő arginin egységek száma, valamint a daunomicin és az oligoarginin közötti kötés típusa hogyan befolyásolja a konjugátumok fluoreszcens tulajdonságait, stabilitását, sejtbejutási képességét és *in vitro* citosztatikus hatását.

b) Tanulmányozni kívántam a daunomicin-LTVSPWY konjugátum stabilitását, továbbá a konjugátum sejtbejutását és *in vitro* citosztatikus hatását is. Azonosítani kívántam a lizoszomális emésztés során létrejövő metabolito(ka)t, illetve a DNS-hez történő kötődés mértékét.

c) A daunomicin-GnRH-III konjugátumok esetén vizsgálni kívántam, hogy a beépített távtartó egység hogyan befolyásolja a konjugátum *in vitro* citosztatikus hatását, valamint azt, hogy a konjugátumokból lizoszomális emésztést követően milyen metabolitok keletkezhetnek és melyik milyen mértékben kötődik a DNS-hez.

d) A pemetrexed-tartalmú konjugátumok esetén azt kívántam meghatározni, hogy van-e különbség a különböző célbajuttató egységet tartalmazó konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásában.

A fentiekén kívül szerettem volna vizsgálni, hogy a daunomicin, illetve annak konjugátumai a kezelt sejteken milyen fehérje szintű változásokat okoznak. Ehhez két hatékony daunomicin-konjugátumot terveztem kiválasztani. A proteomikai vizsgálatokhoz meg kívántam határozni az optimális kezelési időt és koncentrációt. A megváltozott expressziójú fehérjék azonosítása a későbbiekben hasznos támpontokat adhat terápiás célpontok kiválasztásához.

## MÓDSZEREK

### *A Dau=Aoa-LTVSPWY-NH<sub>2</sub> konjugátum előállítása*

A peptidet szilárdfázisú peptidszintézissel Rink-Amid MBHA gyantán Fmoc/tBu stratégiával állítottam elő. A hordozóhoz kötött peptidről lehasítottam az Fmoc védőcsoportot, majd Boc-aminoxi-ecetsavat kapcsoltam a szabad N-terminálissal rendelkező peptidhez. Az így előállított származékot - kémiai jellemzést követően - konjugáltam daunomicinnel oxim-kötés kialakításával. A konjugálás során képződött terméket tisztítottam félpreparatív RP-HPLC-vel. A tisztított konjugátum kémiai jellemzése analitikai RP-HPLC, ESI-MS és aminosav analízis módszerekkel történt.

### *A Dau=Aoa-LTVSPWY-NH<sub>2</sub> konjugátum stabilitásának analízise*

Az előállított Dau=Aoa-LTVSPWY-NH<sub>2</sub> konjugátum stabilitását analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem különböző kémhatású 0,1 M-os nátrium-citrát/citromsav pufferekben (pH: 2,5; 5,0 és 7,0), valamint 10% szérumtartalmú sejtenyészítő médiumban. A konjugátum stabilitását 0, 3, illetve 24 óra elteltével határoztam meg.

### *A daunomicin-konjugátumok lebomlása patkány máj lizoszóma preparátumban*

Patkány máj lizoszóma homogenátumban meghatároztam a Dau=Aoa-LTVSPWY-NH<sub>2</sub>, a GnRH-III(Dau=Aoa), a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) és a GnRH-III(Dau=Aoa-YRRL) konjugátumok stabilitását. A konjugátumok oldatát és a lizoszóma preparátumot felhasználva reakciókeveréket készítettem, amelyből mintát vettem 5 perc, 1, 2, 4, 6, 8 és 24 óra elteltével. Ezt követően a minták analízise LC-MS segítségével történt.

### *A daunomicin-konjugátumok és azok lizoszomális emésztése során keletkező metabolitok abszorpció és emissziós tulajdonságainak jellemzése*

A daunomicin-származékokból  $c = 10 \mu\text{M}$  koncentrációjú oldatokat készítettem Tris pufferben (pH: 7,4), majd rögzítettem azok abszorpció és emissziós spektrumait (előbbi Cary 4E spektrofotométer, utóbbit pedig FluoroLog-3 spektrofluorométer segítségével). Az emissziós spektrumok felvételéhez a mintákat 488 nm-en gerjesztettem, mivel az áramlási citometriás méréseknél is ezt a gerjesztési hullámhosszt alkalmaztam. A daunomicin-származékok emisszióját 495 és 800 nm között rögzítettem.

#### *A daunomicin-származékok kötődése DNS-hez*

Az abszorpciós és emissziós spektrumokat a fenti módon felvettem kettős szálú DNS jelenlétében is. A látszólagos kötődési állandó kiszámítása az emissziós spektrumok felhasználásával McGhee és Von Hippel modellje szerint történt.

#### *In vitro citosztatikus hatás és citotoxicitás meghatározása MTT-tesztel*

A konjugátumok és a szabad hatóanyagok *in vitro* citosztatikus hatását, valamint egyes esetekben *in vitro* citotoxicitását MTT-tesztel határoztam meg. A sejtvonalak és a kezelési idő kiválasztásánál figyelembe vettem, hogy milyen célbajuttató egységet, illetve hatóanyagot tartalmaz az adott konjugátum.

A sejteket a vizsgált vegyületek  $c = 2,56 \times 10^{-4}$  és  $c = 100 \mu\text{M}$  közötti koncentrációjú oldatával kezeltem. A citotoxicitás mértékét a kezelést követően MTT-tesztel határoztam meg. A citosztatikus hatás meghatározásához a kezelési idő letelte után (amely a GnRH-tartalmú konjugátumok esetében 6, a többi anyag esetében 3 óra volt) a sejteket mostam, majd szérumtartalmú médiumban további 72 órán át fenntartottam. 72 óra elteltével a vegyületek citosztatikus hatását MTT-tesztel határoztam meg. Az MTT-tesztet követően az egyes koncentrációkhoz tartozó citosztázis % (vagy citotoxicitás %) kiszámítása után ábrázoltam azt a koncentráció függvényében és a görbe alapján meghatároztam azt a koncentráció értéket, amely a sejtek 50%-át elpusztítja (citotoxicitás) vagy gátolja az osztódásban (citosztázis). Ez az érték az  $\text{IC}_{50}$ .

#### *A daunomicin-konjugátumok sejtbejutásának vizsgálata áramlási citometriával*

A sejteket másfél, illetve hat órán át kezeltem az egyes daunomicin-konjugátumok oldataival ( $c = 0,8\text{--}100 \mu\text{M}$ ). A kezelést és a mosást követően a sejteket tripszinnel kezeltem, hogy a felszínükön lévő daunomicin-származékokat eltávolítsam, és így csak a sejtekben lévő konjugátum fluoreszcenciáját detektáljam. További mosási lépéseket követően mértem a sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel. A kiértékelés során a kezeletlen kontroll sejtek autofluoreszcenciájával korrigáltam a mért fluoreszcencia intenzitás értékét. A fluoreszcencia intenzitásból, illetve a kezeletlen kontroll sejteknél nagyobb fluoreszcenciával rendelkező sejtek arányából lehet következtetni a sejtbejutás mértékére.

### *Fehérjeexpressziós profil meghatározása daunomicinnel, illetve annak konjugátumaival történő kezelést követően*

Az előzetes kísérletek alapján hatékonynak talált két konjugátumot kiválasztottam proteomikai vizsgálatok céljára. A kezelési körülmények optimalizálását követően HL-60 sejteket kezeltem 24, illetve 48 órán keresztül  $\text{Dau=Aoa-LTVSPWY-NH}_2$ ,  $\text{Dau=Aoa-R}_6\text{-NH}_2$  konjugátummal vagy daunomicinnel. A kezelést követően a sejtekből fehérjét izoláltam, majd ezekkel a mintákkal kétdimenziós gélelektroforézist végeztem. A géleket összehasonlítottam, majd a szignifikánsan különböző foltokat kivágtam és tripszinnel történő emésztést követően a mintákat liofilizáltam. Az ezt követő elválasztás és analízis OrbiTrap nano LC-MS/MS készülékkel, a fehérjék azonosítása pedig MASCOT adatbázis használatával történt.

## EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

### **A.) Oligoarginin-tartalmú daunomicin-konjugátumok**

1. Összehasonlítottam az azonos kötéstípusú, de különböző számú arginin egységeket tartalmazó daunomicin-oligoarginin konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását és sejtbefutását HL-60 és HepG2 sejteken.

Az *oxim-kötést tartalmazó konjugátumok* esetén nem tapasztaltam jelentős különbséget a 4, 6, illetve 8 arginin egységet tartalmazó konjugátum hatásában egyik sejtvonalon sem. A sejtbefutás mértékét tekintve csak HepG2 sejteken kaptunk különbséget, ott is csak  $c = 20 \mu\text{M}$  koncentráció esetén; ebben az esetben a nyolc arginin egységet tartalmazó konjugátum befutása volt jelentősebb.

A *négyszögsavat tartalmazó konjugátumok* közül a hat arginin egységgel rendelkezőnek volt a legkisebb az  $\text{IC}_{50}$  értéke, és HL-60 sejtekbe is ez jutott be legjobban a három konjugátum közül.

A *hidrazon-kötést tartalmazó konjugátumok* hatásában nem tapasztaltunk jelentős különbséget. A sejtbefutási kísérletek adatai viszont azt mutatják, hogy a nyolc arginint tartalmazó Dau-hidrazon konjugátum sokkal nagyobb mértékben befutott, mint a csoport többi tagja HL-60 sejtek esetén.

A *szukcinilezett daunomicin-származékot tartalmazó konjugátumok* közül a nyolc arginin egységet tartalmazó konjugátum volt a leghatásosabb mindkét tumorsejtvonalon. A HL-60 sejtek azonban a Dau-Suc- $\text{R}_6\text{-NH}_2$  konjugátumot vették fel legnagyobb mértékben.

2. Összehasonlítottam azon konjugátumok biológiai sajátosságait, amelyek azonos számú arginin egységet tartalmaznak, azonban a daunomicin és az oligoarginin közötti kötés típusa eltérő. HL-60 és HepG2 sejteken az oxim- és hidrazon-kötést tartalmazó konjugátumok közel ugyanolyan *in vitro* citosztatikus hatást mutattak és így ennek a két csoportnak a konjugátumai hatásosabbak voltak, mint a négyszögsavat tartalmazó és a szukcinilezett származékok. Utóbbi két csoport konjugátumai a sejtbefutás szempontjából sem bizonyultak hatásosnak. A HL-60 sejtek az oxim- és hidrazon-kötést tartalmazó konjugátumokat vették fel legjobban. HepG2 sejteken a négyszögsavat tartalmazó konjugátumok bizonyultak jobbnak sejtbefutás szempontjából.

Eredményeink azt sugallják, hogy a sejtbefutás szükséges, de nem elégséges feltétele a hatás kifejtésének. Fontos tényező az, hogy a bejutást követően a konjugátum milyen intracelluláris folyamatokon megy keresztül és fel tud-e szabadulni a hatóanyag vagy a konjugátum aktív metabolitja. Kísérleteink bizonyítják, hogy a daunomicin és az oligoarginin közti kötés típusa, a konjugátumokban lévő arginin egységek száma és az alkalmazott sejttypus együttesen befolyásolja a sejtbefutás és az *in vitro* citosztatikus hatás mértékét.

3. A fenti eredmények alapján kiválasztottam a  $\text{Dau=Aoa-R}_6\text{-NH}_2$  konjugátumot azzal a céllal, hogy meghatározzam, hogyan változik meg a kezelés hatására a HL-60 sejtek fehérjeexpressziós profilja. Megállapítottam, hogy a kezelés hatására chaperonok (pl. HSP60, HSP90 különböző formái) vagy olyan fehérjék expressziója változott meg, amelyek tumoros jelátviteli folyamatokban vesznek részt (pl. Rho GDP-disszociáció inhibitor 2), de vannak köztük sejtvázas-fehérjék is (pl. aktin és tubulin különböző formái). Olyan fehérjék expressziója is megváltozott a kezelések hatására, amelyek anyagcsere folyamatokban vagy azok szabályozásában vesznek részt (pl. laktát dehidrogenáz, aminopeptidáz, foszfoglicerát kináz, fruktóz-biszfoszfát aldoláz).

#### **B.) A $\text{Dau=Aoa-LTVSPWY-NH}_2$ konjugátum**

1. Előállítottam és kémiaiailag jellemeztem a  $\text{Dau=Aoa-LTVSPWY-NH}_2$  konjugátumot. A vegyület stabilitását különböző pH értékű oldatokban és az *in vitro* vizsgálatokhoz használt körülmények között tanulmányoztam és kimutattam, hogy a konjugátum 24 óráig stabil, lizoszóma preparátumban pedig könnyen hasad, így sejten belül fel tud szabadulni az aktív metabolit.

2. Azonosítottam a konjugátum lizoszomális emésztését követően felszabaduló metabolitot. Meghatároztam, hogy a konjugátum és a metabolit milyen mértékben kötődik duplaszálú DNS-hez. Azt tapasztaltam, hogy mindkét vegyület kötődött a DNS-hez, azonban a kötődés mértéke mindkét esetben kisebb volt, mind a szabad daunomicin esetén.

3. Meghatároztam a konjugátum *in vitro* citosztatikus hatását HepG2, HL-60, MCF-7 és SK-BR-3 sejteken. Megállapítottam, hogy a Dau=Aoa-LTVSPWY-NH<sub>2</sub> konjugátum *in vitro* citosztatikus hatása jelentősnek bizonyult és a sejtbejutás tekintetében is egyike a leghatékonyabb daunomicin-konjugátumainknak. Azokon a sejteken, amelyek az irodalmi adatok szerint nem expresszálják felszínükön az ErbB2 receptort (MCF-7 sejtek) hatásosabbnak bizonyult a konjugátum, mint a receptort nagy mennyiségben expresszáló SK-BR3 sejtek esetén. Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy az SK-BR-3 sejteken a daunomicin is jóval kisebb hatást mutatott, mint MCF-7 sejteken.

4. Meghatároztam a konjugátum sejtbejutásának mértékét HepG2, HL-60, MCF-7 és SK-BR-3 sejteken. Az SK-BR-3 sejtekbe nagyobb mértékben jutott be a konjugátum, mint MCF-7 sejtekbe, így valószínűsíthető, hogy valóban az ErbB2 receptoron keresztül történik a bejutás. Mivel azonban MCF-7 sejteken is tapasztaltunk bizonyos mértékű sejtbejutást, feltételezhető, hogy létezik egy másik mechanizmus is, amely az MCF-7 sejtek esetén érvényesül. Mivel ez a konjugátum hatásosnak bizonyult HL-60 sejteken, ezért az ezzel kezelt HL-60 sejtek fehérjeexpressziós profiljának vizsgálatát is elvégeztük 24, illetve 48 órás kezelést követően.

5. Megállapítottam, hogy a kezelés hatására chaperonok (pl. HSP70) és olyan fehérjék expressziója változott meg, amelyek tumoros jelátviteli folyamatokban vesznek részt (pl. Ranspecifikus GTPáz aktiváló fehérje, Rho GDP-disszociáció inhibitor 2). Olyan fehérjék expressziója is megváltozott, amelyek anyagcsere folyamatokban vagy azok szabályozásában vesznek részt (pl. foszfogllicerát dehidrogenáz, fruktóz-biszfoszfát aldoláz).

### **C.) GnRH-III-tartalmú daunomicin-konjugátumok**

1. Meghatároztam a GnRH-III(Dau=Aoa), GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) és a GnRH-III(Dau=Aoa-YRRL) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 és MCF-7 sejteken. Mindhárom konjugátum jobban gátolta az MCF-7 sejtek osztódását, mint a HT-29 sejteket. Jelentős különbséget nem tapasztaltunk a távtartó egységet nem tartalmazó GnRH-III(Dau=Aoa) és a másik két konjugátum hatásában, de HT-29 sejteken az YRRL távtartót



tartalmazó konjugátum kevésbé volt hatásos, mint a GFLG-t tartalmazó vagy távtartó nélküli konjugátum.

2. Azonosítottam a lizoszomális emésztés hatására felszabaduló metabolitokat a fenti GnRH-konjugátumok esetén. A GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátum legkisebb daunomicin-tartalmú bomlásterméke a H-Lys(Dau=Aoa)-OH volt, az YRRL távtartót tartalmazó konjugátumból Dau=Aoa-Tyr-OH keletkezett, a GFLG távtartót tartalmazó konjugátumból pedig Dau=Aoa-Gly-OH szabadult fel az emésztés hatására. Megállapítható, hogy a metabolitok a DNS-hez közel azonos mértékben kötődtek, de az YRRL távtartót tartalmazó konjugátumból felszabaduló Dau=Aoa-Tyr-OH gyengébb kötődést mutatott.

#### D.) A pemetrexed-konjugátumok

Meghatároztam az oktaarginint és/vagy IELLQAR peptidet tartalmazó pemetrexed-konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását NCI-H358 és HL-60 sejtvonalakon. A konjugátumok hatását tekintve nem találtunk szignifikáns különbségeket.

### A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Bánóczy Z., Peregi B., **Orbán E.**, Szabó R., Hudecz F.: Synthesis of daunomycin-oligoarginine conjugates and their effect on human leukemia cells (HL-60) ARKIVOC, 2008. (iii) 140-143
2. Szabó I., Manea M., Bősze Sz., Szabó R., **Orbán E.**, Gaál D., Przybylski M., Hudecz F., Mező G.: Development of an oxime bond containing daunomycin-gonadotropin-releasing hormone-III conjugate as a potential multivalent anticancer drug, Bioconjugate Chemistry, 2009., 20 (4): 656-665
3. Miklán Zs.\*, **Orbán E.\***, Csík G., Schlosser G., Magyar A., Hudecz F.: New daunomycin-oligoarginine conjugates; synthesis, characterization and effect on human leukemia and human hepatoma cells, Biopolymers Peptide Science, 2009., 92(6): 489-501
4. **Orbán E.**, Mező G., Schlage P., Csík G., Kulic Z., Ansorge P., Fellinger E., Möller H.M., Manea M.: *In vitro* degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites, Amino Acids, 2010. (doi: 10.1002/psc.1294)
5. Miklán Zs.\*, **Orbán E.\***, Bánóczy Z., Hudecz F.: New pemetrexed-peptide conjugates: synthesis, characterization and cytostatic effect on non-small cell lung carcinoma (NCI-H358) and human leukemia (HL-60) cells, 2011. (beküldve)
6. **Orbán E.**, Bősze Sz., Manea M., Marquadt A., Bánóczy Z., Csík G., Fellinger E., Hudecz F.: Synthesis, characterization, and *in vitro* biological properties of a new daunomycin-peptide conjugate, 2011. (kéziratban)

\* megosztott első szerző

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. **Orbán E.**, Szabó E., Lotz G., Kupcsulik P., Páska Cs., Schaff Zs., Kiss A.: Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors, *Pathology & Oncology Research*, 2008., 14(3): 299-306
2. Bai K.B., Láng O., **Orbán E.**, Szabó R., Kóhidai L., Hudecz F., Mező G.: Design, synthesis and *in vitro* activity of recent drug delivery systems, containing tuftsin derivatives and methotrexate, *Bioconjugate Chemistry*, 2008., 19(11): 2260-2269
3. Nagy K., **Orbán E.**, Bösze Sz., Kele P.: Clickable Long-Wave “Mega-Stokes” Fluorophores for Orthogonal Chemoselective Labeling of Cells, 2010., *Chemistry An Asian Journal*, 5(4): 773-7
4. Bánóczi Z., Gorka-Kereskényi Á., Reményi J., **Orbán E.**, Hazai L., Tőkési N., Oláh J., Ovádi J., Béni Z., Háda V., Szántay Cs., Jr., Hudecz F., Kalaus Gy., Szántay Cs.: Synthesis and *in vitro* antitumor effect of vinblastine derivative-oligoarginine conjugates, *Bioconjugate Chemistry*, 2010., 21(11): 1948-1955
5. Mező G., Szabó I., Kertész I., Hegedüs R., **Orbán E.**, Leurs U., Bösze Sz., Halmos G., Manea M.: Efficient synthesis of an (aminooxy) acetylated-somatostatin derivative using (aminooxy)acetic acid as a 'carbonyl capture' reagent, *Journal of Peptide Science*, 2011. (DOI: 10.1002/psc.1294)
6. Leurs U., Mező G., **Orbán E.**, Öhlschläger P., Marquardt A., Manea M.: Design, synthesis, *in vitro* stability and cytostatic effect of multifunctional anticancer drug-bioconjugates containing GnRH-III as a targeting moiety, *Biopolymers*, 2011. (DOI: 10.1002/bip.21640)